

Rec PCT/PTO 19 DEC 2005 SB

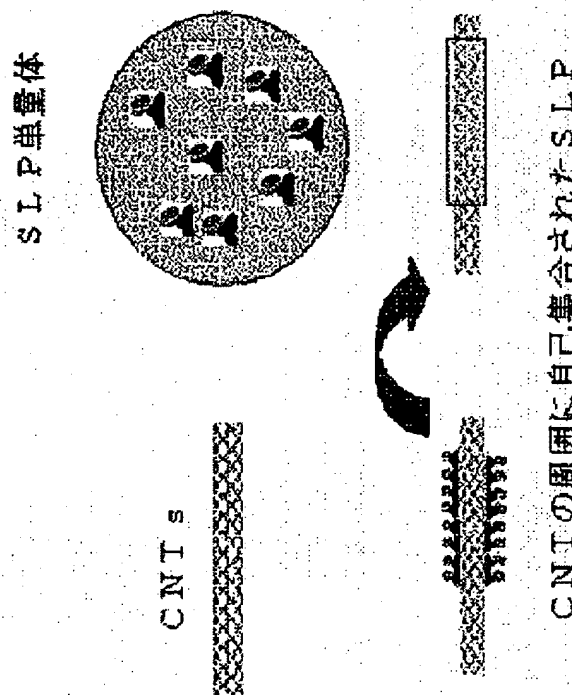
MANUFACTURING METHOD FOR CARBON NANOTUBE WRAPPED WITH SELF-ASSEMBLY SUBSTANCE

Patent number: JP2005156534
Publication date: 2005-06-16
Inventor: LEE SAN YAPPU; JUNG HEE TAE; LEE SEOKU JEE;
PARK JON PIRU; PARK TEE JUN; CHOI JON HYUN
Applicant: KOREA INST SCIENCE TECHNOLOGY
Classification:
- international: G01N33/543; C12Q1/25; C12Q1/68; G01N33/545;
G01N33/68; C07K14/195
- european:
Application number: JP20040226211 20040802
Priority number(s): KR20030084888 20031127

Report a data error here

Abstract of JP2005156534

<P>**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a water-soluble CNT wrapped with a self-assembly substance and a manufacturing method for it. <P>**SOLUTION:** This manufacturing method for the carbon nanotube includes a process for providing a mixture of the self-assembly substance and the CNT and a process for wrapping the CNT with the self-assembly substance by treating the mixture in a condition that the self-assembly substance is assembled by itself on the CNT. <P>**COPYRIGHT:** (C) 2005,JPO&NCIP



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-156534

(P2005-156534A)

(43) 公開日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/543

G 0 1 N 33/543 5 2 5 U

2 G 0 4 5

C 1 2 Q 1/25

C 1 2 Q 1/25

4 B 0 6 3

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

Z

4 H 0 4 5

G 0 1 N 33/545

G 0 1 N 33/545

Z

G 0 1 N 33/68

G 0 1 N 33/68

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-226211 (P2004-226211)

(22) 出願日 平成16年8月2日 (2004.8.2)

(31) 優先権主張番号 2003-084888

(32) 優先日 平成15年11月27日 (2003.11.27)

(33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 502318478

コリア アドバンスド インスティテュー
ト オブ サイエンス アンド テクノロ
ジィ大韓民国、タエジョン、ユソク、クソン
ドン 373-1

(74) 代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74) 代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己集合物質でラッピングされたカーボンナノチューブの製造方法

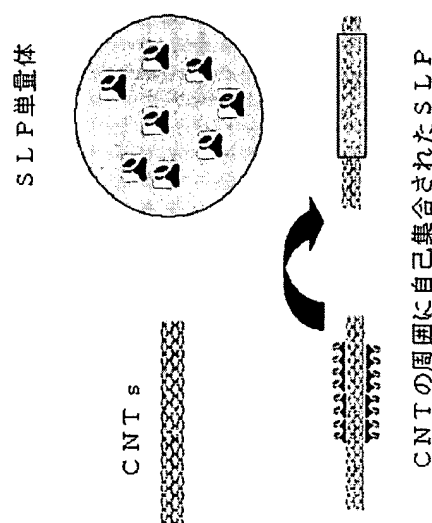
(57) 【要約】

【課題】 自己集合物質でラッピングされている水溶性 CNT 及びその製造方法を提供することにある。

【解決手段】 自己集合物質と CNT との混合物を提供する工程；及び前記混合物を前記自己集合物質が CNT の上で自己集合される条件で処理して自己集合物質で CNT をラッピングする工程を含む自己集合物質でラッピングされた水溶性 CNT の製造方法を提供する。

本発明はまた、上記方法によって製造され、自己集合物質でラッピングされている水溶性 CNT を提供する。

【選択図】 図3



【特許請求の範囲】

【請求項1】

自己集合物質とCNTとの混合物を提供する工程；及び該混合物を該自己集合物質がCNT上に自己集合される条件で処理して自己集合物質でCNTをラッピングする工程を含む、自己集合物質でラッピングされた水溶性CNTの製造方法。

【請求項2】

前記自己集合物質はSLPまたはSLPサブユニットであることを特徴とする、請求項1に記載の水溶性CNTの製造方法。

【請求項3】

前記SLPは *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophilia*, *Geobacillus stearthermophilus*, *Bacillus stearthermophilus*, *Acetogenium kivui*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus brevis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus sphaericus*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Comamonas acidovorans*, *Delftia acidovorans*, *Deinococcus radiodurans*, *Phormidium uncinatum*, *Sporosarcina ureae*, *Thermoanaerobacter kivui*, *Thermoanaerobacter Thermohydrosulfuricus* 及び *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* で構成された群から選択されるバクテリア由来であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記SLPは *Acidianus (Sulfolobus) brierleyi*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Desulfurolobus ambivalens*, *Halobacterium halobium (salinarum)*, *Halobacterium volcanii*, *Hyperthermus botylicus*, *Methanoplanus limicola*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrobaculum organotrophum*, *Pyrodictium brockii*, *Pyrodictium occultum*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus shibatae*, *Sulfolobus solfataricus*, *Staphylothermus marinus*, *Thermococcus celer* 及び *Thermoproteus tenax* で構成された群から選択されるアルケ由来であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

前記SLPは *Geobacillus stearothermophilus* 由来であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項6】

請求項1または請求項2の方法により製造され、自己集合物質でラッピングされている水溶性CNT。

【請求項7】

請求項6に記載の自己集合物質でラッピングされている水溶性CNTに標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターを取り付けることを特徴とするバイオセンサーの製造方法。

【請求項8】

前記レセプターは酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、コファクターまたは炭水化物であることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法により製作され、自己集合物質でラッピングされている CNT に標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターが取り付けられていることを特徴とするバイオセンサー。

【請求項 10】

前記レセプターは酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、コファクターまたは炭水化物であることを特徴とする、請求項 9 に記載のバイオセンサー。

【請求項 11】

請求項 9 に記載のバイオセンサーを利用することを特徴とする、レセプターに結合するか反応する標的バイオ物質或いは有機化合物を検出する方法。 10

【請求項 12】

標的バイオ物質或いは有機化合物はタンパク質、核酸、酵素、抗体、炭水化物または脂質であることを特徴とする、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己集合 (self-assembly) 物質でラッピング (wrapping) された水溶性カーボンナノチューブ (carbon nanotube: CNT)、その製造方法及び該自己集合物質でラッピングされた CNT に標的バイオ物質と結合するか反応するレセプターが選択的に取り付けられているバイオセンサーに関する。 20

【背景技術】

【0002】

CNT とは、地球上に多量に存在する炭素からなる炭素同素体であり、一つの炭素が他の炭素原子と六角形の蜂の巣柄に結合されてチューブ形状になっている物質であって、チューブの直径がナノメートル (nm = 10 億分の 1 メートル) 水準の極めて小さな領域の物質である。CNT は、優秀な機械的特性、電気的選択性、優れた電界放出特性、高効率の水素貯蔵媒体特性などを有しながら、現存する物質の中で欠陥がほとんどない完璧な新素材として知られている。

【0003】

CNT は、各種装置の電子放出源 (electron emitter)、VFD (vacuum fluorescent display)、白色光源、FED (field emission display)、リチウムイオン 2 次電池電極、水素貯蔵燃料電池、ナノワイヤ、ナノカプセル、ナノピンセット AFM/STM チップ (tip)、単電子素子、ガスセンサー、医・工学用微細部品、高機能複合体等で無限な応用可能性を示している。 30

【0004】

CNT は、このように力学的強固性と化学的安全性が優れ、半導体及び導体の性質を持ち合わせており、直径が短く、長さが相対的に非常に長い特性を持ち、平板表示素子、トランジスター、エネルギー貯蔵体などの素材として優れた性質を示し、ナノサイズの各種センサーへの応用性が非常に高い (非特許文献 1 参照)。 40

【0005】

一方、CNT を生命工学分野で応用する事例が最近多く登場している。グルコースセンサー、蛋白質の検出、特定 DNA 配列の検出 (非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 4 参照) などのバイオセンサーに対する CNT の応用可能性が提示されている。CNT を基盤とした多層 (multilayer) からの生物分子検出は、表面積が広くて電気伝導度にも優れていて、DNA のような生物分子が固定される量が増え、生物分子に対する検出敏感度が増大できる。

【0006】

しかし、現在まで知られている CNT 物質は全ての有機溶媒に対して不溶性を持ってい 50

て応用において多くの制限を有し（非特許文献5参照）、また分子レベルでCNTの化学性質を理解することが難しかった（非特許文献6参照）。

【0007】

最近、高分子、天然高分子、炭水化物及びペプチドを用いた共有結合、非共有結合及びミセル技法を通じてCNTの溶解性を高めるための研究が進行して来た（非特許文献7、非特許文献8、非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11、非特許文献12、非特許文献13、非特許文献14参照）。

【0008】

また、物理的な吸着を利用して炭水化物をCNTに結合またはラッピングしてバイオセンサーとしての応用可能性を提示した（非特許文献11、非特許文献15参照）。しかし、このような方法はCNTの表面に炭水化物が単に物理的な吸着またはファンデルワールス力（*van der Waals*）によって結合されていて結合力が弱いだけでなく、結合した炭水化物の配向を正確に調節し難いという大きい短所がある（非特許文献16参照）。

【0009】

最近、ナノバイオテクノロジー分野で優秀な自己集合性質を有するSLP（細胞表面タンパク質）に高い関心を持つようになった。SLPの最も大きい特徴はその結晶配列（*crystalline array*）構造にある。多くの他の種類のグラム陰性及びグラム陽性バクテリアまたはアルケ（*Archae*）などでもSLPが発現されている（非特許文献17参照）。SLPは1, 2, 4, 6個のサブユニットで構成され、傾き形、四角形、六角形の対称格子構造を持っていて、各格子の距離が2.5～35nmで一定になっている。各々のサブユニットは非共有タンパク質-タンパク質結合によって多くの多様な条件の溶液で自己集合する性質を有すると知られている（非特許文献18、非特許文献19参照）。しかし、一般的な条件では前記のような結晶配列構造を持つことが非常に難しくその構造も非共有タンパク質-タンパク質結合として弱いと知られている。このような配向性を持って自己集合することにおいて一部のバクテリアから由来されたSLPの場合シリコン、金属、高分子などの基質の表面で自己集合する結果が報告された（非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22参照）。

【0010】

最近、本発明の発明者らは酵素反応を用いて炭水化物をCNTにラッピングして、前記炭水化物でラッピングされた水溶性CNTにバイオレセプターを結合させてバイオセンサーを製作したことがある（特許文献1参照）。CNT表面に結合される炭水化物の結合力が補強されて、炭水化物の配向などが正確に調節できる長所があるが、炭水化物のラッピング効率が少し落ちる短所がある。

【0011】

それで、本発明者らはラッピングの効率が低い水溶性CNTを開発しようと鋭意努力した結果、精製されたSLPが高い配向性を持って安定にCNTの周りに自己集合を通じて高効率でラッピングされることを確認して、本発明を完成することに至った。

【特許文献1】PCT/KR03/02164

【非特許文献1】Dai, H. et al., *ACC. Chem. Res.*, 35:1035, 2002

【非特許文献2】Sotiropoulou, S. et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 375:103-5, 2003

【非特許文献3】Chen, R. J. et al., *PNAS*, 100:4984-9, 2003

【非特許文献4】Cai, H., et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, 375:287-93, 2003

【非特許文献5】Bochrath, M., *Science*, 275:1992, 1997

【非特許文献6】Chen, J. et al., *Science*, 282:95, 1998

9 8

【非特許文献7】O'Connell, M. J. et al., Chem. Phys. Lett., 342:265, 2001

【非特許文献8】Chen, J. et al., JACS, 124:9034, 2002

【非特許文献9】Mitchell, C. A. et al., Macromolecules, 35:8825, 2002

【非特許文献10】Kang, Y. et al., JACS, 125, 5650, 2003

【非特許文献11】Wang et al., Analyst., 127:1353, 2002

10

【非特許文献12】Star and Stoddart, Macromolecules, 35:7516, 2002

【非特許文献13】Bandyopadhyaya et al., Nano Lett., 2:25, 2002

【非特許文献14】Pantarotto et al., Chemistry & Biology, 10:961, 2003

【非特許文献15】Star, A. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 41:2508, 2002

【非特許文献16】Chamber, G. et al., Nano Lett., 3:843, 2003

20

【非特許文献17】Pum and Sleyter, Nanotechnol., 17:8, 1999

【非特許文献18】Sleytr et al., Trend. Microbiol., 7:253, 1999

【非特許文献19】Gyorvary et al., Nano Lett., 3:315, 2003

【非特許文献20】Moll et al., PNAS, 99:14646, 2002

【非特許文献21】Shenton et al., Nature, 389:585, 1997

30

【非特許文献22】Kuen et al., J. bacteriol., 179:1664, 1997

【非特許文献23】Breitwieser et al., BioTechniques, 21:918, 1996

【非特許文献24】Petrou et al., Biosens. Bioelectron., 17:859, 2002

【非特許文献25】Rao et al., Science, 275:187, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

40

【0012】

本発明の目的は、自己集合物質でラッピングされている水溶性CNT及びその製造方法を提供することにある。

【0013】

本発明の他の目的は、前記自己集合物質でラッピングされている水溶性CNTに多様な種類のバイオレセプターを取り付けたバイオセンサー及びその製造方法を提供することにある。

【0014】

本発明のまた他の目的は、前記バイオセンサーを用いて多様な種類のレセプターに結合するか、反応する多様な標的バイオ物質を検出する方法を提供することにある。

50

【課題を解決するための手段】

【0015】

前記目的を達成するために、本発明は自己集合物質とCNTの混合物を提供する工程；及び前記混合物を前記自己集合物質がCNTの上で自己集合される条件で処理して自己集合物質でCNTをラッピングする工程を含む自己集合物質でラッピングされた水溶性CNTの製造方法を提供する。

【0016】

本発明において、自己集合性質を有する自己集合物質はSLPまたはSLPサブユニットであることを特徴とすることができ、前記SLPは*Acetogenium kivui*, *Acetogenium kivui*, *Acetogenium kivui*, *Aeromonas salmonicida*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus brevis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus sphaericus*, *Caulobacter crescentus*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Comamonas acidovorans*, *Delftia acidovorans*, *Deinococcus radiodurans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Phormidium uncinatum*, *Sporosarcina ureae*, *Thermoanaerobacter kivui*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*及び*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*で構成された群から選択されるバクテリア由来または*Acidianus (Sulfolobus) brierleyi*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Desulfurococcus mobilis*, *Desulfurolobus ambivalens*, *Halobacterium halobium (salinarum)*, *Halobacterium volcanii*, *Hyperthermus botylicus*, *Methanoplanus limicola*, *Pyrobaculum islandicum*, *Pyrobaculum organotrophum*, *Pyrodictium brockii*, *Pyrodictium occultum*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus shibatae*, *Sulfolobus solfataricus*, *Staphylothermus marinus*, *Thermococcus celer*及び*Thermoproteus tenax*で構成された群から選択されるアルケ由来であることを特徴とすることができる。より好ましくは、前記SLPは*Geobacillus stearothermophilus*由来であることを特徴とすることができる。

【0017】

本発明はまた、前記方法によって製造され、自己集合物質でラッピングされている水溶性CNTを提供する。

【0018】

本発明はまた、前記自己集合物質でラッピングされている水溶性CNTに標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターを取り付けることを特徴とするバイオセンサーの製造方法を提供する。

【0019】

本発明はまた、前記方法により製作され、自己集合物質でラッピングされているCNTに標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターが取り付けられていることを特徴とするバイオセンサー及び前記バイオセンサーを利用することを特徴とする前記レセプターに結合するか前記レセプターと反応するか結合する標的バイオ物質の検出方法を提供する。

【0020】

本発明はまた、前記方法により製作され、S L PまたはS L Pサブユニットでラッピングされている水溶性C N Tを提供する。

【0021】

本発明はまた、前記S L PまたはS L Pサブユニットでラッピングされている水溶性C N Tに標的バイオ物質または有機化合物と反応するか、結合するレセプターを取り付けることを特徴とするバイオセンサーの製造方法を提供する。

【0022】

本発明はまた、前記方法により製作され、S L PまたはS L PサブユニットでラッピングされているC N Tに標的バイオ物質または有機化合物と反応するか、結合するレセプターが取り付けられていることを特徴とする前記バイオセンサー及び前記バイオセンサーを利用することを特徴とする前記レセプターに結合するか、前記レセプターと反応する標的バイオ物質の検出方法を提供する。

10

【0023】

本発明において、標的バイオ物質または有機化合物は前記レセプターに結合するか、前記レセプターと反応して標的の役割ができる物質で、好ましくはタンパク質、核酸、抗体、酵素、炭水化物、脂質または他のバイオ分子であって、より好ましくは質病に関するタンパク質である。

【0024】

本発明において、レセプターは酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、コファクターまたは炭水化物であることを特徴とすることができる。

20

【0025】

本発明で使用される“自己集合物質”という用語は非共有結合（水素結合、イオン結合、ファンデルワールス結合（*van der Waals attraction*）、疎水性結合、静電氣的結合等）により誘導され支持体に集合される物を包括する概念で、脂質、タンパク質、ペプチド、DNA、RNA、他の有機物質を含む。自己集合を通じて形成された物質は一定な配向と構造を有し、また機能性を維持することを特徴とする。広く知られている自己集合としては脂質二重膜（*lipid bilayer*）、リポソーム（*liposome*）、ウイルス表面タンパク質（*virus coat protein*）、S L P、DNA、RNA等が、C N T上で自己集合されて水溶性を示す有機超分子も本発明の自己集合物質として用いられる。

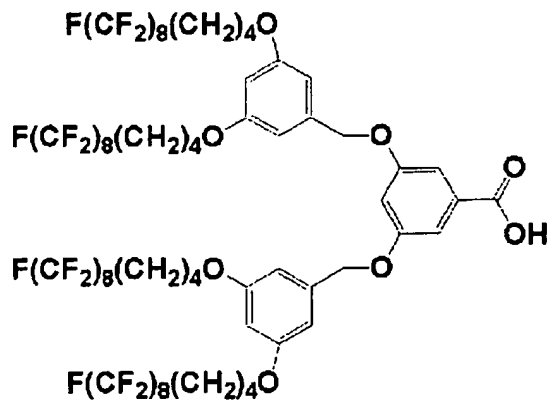
30

【0026】

自己集合する有機超分子としては、図1で示すように、円板型又はディスク型デンドリマー1、扇形の（*fan-shaped*）有機超分子2、棒状鎖型又は円錐型の分子5などがある。扇形の有機超分子の一例としては下記の化学式1の化合物を、円板型有機超分子の一例としては、下記の化学式2の化合物を、また円錐型有機超分子の一例としては下記の化学式3の化合物がそれぞれ挙げられる。

【0027】

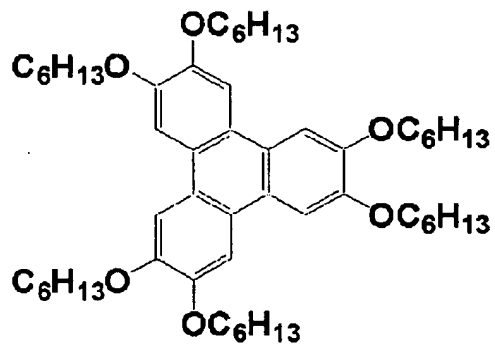
【化 1】



10

【 0 0 2 8 】

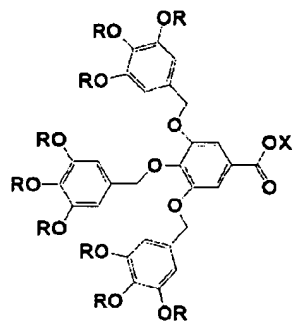
【化 2】



20

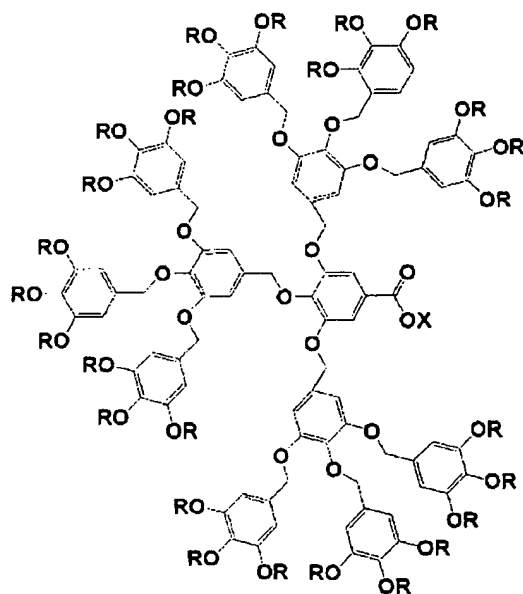
【 0 0 2 9 】

【化 3】



40

【化 4】



10

20

【0030】

このような有機超分子は単量体が共有結合で連結された高分子とは異なり、ファンデルワールス力のような物理的な2次結合によって一定の構造を形成する。かかる有機超分子は適正な温度や濃度、外部磁場、電場などによって自己集合を行って特定の微細構造を形成する。扇形の分子が自己集合によって板状構造1を形成し、この板状構造が集まって円柱形態3を作り、更に円柱が六角形に配列された3次元構造4を形成する(図1a)。そのほかに円錐型の有機超分子5の場合は、円錐型が自己集合して球型6になし、球が集まって3次元の空間上に一定の構造7で配列される(図1b)。

【0031】

本発明で使用されている“ラッピング”という用語は前記自己集合物質がCNT上に自己集合され、非共有結合によってCNTの表面を囲むことを総称することと定義される。

30

【0032】

本発明で使用される“バイオセンサー”という用語はバイオ物質と反応するか結合するレセプターが自己集合物質でラッピングされているCNTに結合されていることを包括する概念で前記自己集合物質でラッピングされているCNTに結合されているバイオチップを含むものと定義される。

【0033】

また、本発明で使用される“バイオ物質”という用語は核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、酵素基質、リガンド、コファクター、炭水化物、脂質、オリゴヌクレオチド、RNAなどの生体から有来する物質を総称するものと定義される。

40

上記課題を解決するために、本発明は以下を提供する。

(項目1) 自己集合物質とCNTとの混合物を提供する工程；及び該混合物を該自己集合物質がCNT上に自己集合される条件で処理して自己集合物質でCNTをラッピングする工程を含む、自己集合物質でラッピングされた水溶性CNTの製造方法。

(項目2) 上記自己集合物質はSLPまたはSLPサブユニットであることを特徴とする、項目1に記載の水溶性CNTの製造方法。

(項目3) 上記SLPは、*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophilia*, *Geobacillus stearthermophilus*, *Bacillus stearthermophilus*, *Acetogenium kivui*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacill*

50

us brevis, Bacillus polymyxa, Bacillus sphaericus, Caulobacter crescentus, Clostridium aceticum, Clostridium thermohydrosulfuricum, Clostridium thermosaccharolyticum, Comamonas acidovorans, Delftia acidovorans, Deinococcus radiodurans, Phormidium uncinatum, Sporosarcina ureae, Thermoanaerobacter kivui, Thermoanaerobacter Thermohydrosulfuricus 及び Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum で構成された群から選択されるバクテリア由来であることを特徴とする、項目 2 に記載の方法。 10

(項目 4) 上記 SLP は Acidianus (Sulfolobus) brierleyi, Archaeoglobus fulgidus, Desulfurococcus mobilis, Desulfurolobus ambivalens, Halobacterium halobium (salinarum), Halobacterium volcanii, Hyperthermus botylicus, Methanoplanus limicola, Pyrobaculum islandicum, Pyrobaculum organotrophum, Pyrodictium brockii, Pyrodictium occultum, Sulfolobus acidocaldarius, Sulfolobus shibatae, Sulfolobus solfataricus, Staphylothermus marinus, Thermococcus celer 及び Thermoproteus tenax で構成された群から選択されるアルケ由来であることを特徴とする、項目 2 に記載の方法。 20

(項目 5) 上記 SLP は Geobacillus stearothermophilus 由来であることを特徴とする、項目 2 に記載の方法。

(項目 6) 項目 1 または項目 2 の方法により製造され、自己集合物質でラッピングされている水溶性 CNT。

(項目 7) 項目 6 に記載の自己集合物質でラッピングされている水溶性 CNT に標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターを取り付けることを特徴とするバイオセンサーの製造方法。 30

(項目 8) 上記レセプターは酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、コファクターまたは炭水化物であることを特徴とする、項目 7 に記載の方法。

(項目 9) 項目 7 に記載の方法により製作され、自己集合物質でラッピングされている CNT に標的バイオ物質或いは有機化合物と反応するか結合するレセプターが取り付けられていることを特徴とするバイオセンサー。

(項目 10) 上記レセプターは酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、コファクターまたは炭水化物であることを特徴とする、項目 9 に記載のバイオセンサー。

(項目 11) 項目 9 に記載のバイオセンサーを利用することを特徴とする、レセプターに結合するか反応する標的バイオ物質或いは有機化合物を検出する方法。 40

(項目 12) 標的バイオ物質或いは有機化合物はタンパク質、核酸、酵素、抗体、炭水化物または脂質であることを特徴とする、項目 11 に記載の方法。

【発明の効果】

【0034】

本発明は自己集合物質でラッピングされた水溶性 CNT 及びその製造方法を提供する効果がある。本発明による、自己集合物質でラッピングされた CNT は水溶性を示し、一般の CNT と比較して非常に優れた応用性を有する。

【0035】

特に、前記自己集合物質でラッピングされた水溶性 CNT に多様なレセプターを取り付 50

けたバイオセンサーの製作が可能であり、これを利用して前記レセプターに結合するか、反応する標的バイオ物質或いは有機化合物を簡単に検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0036】

以下、本発明をより具体的に説明する。

【0037】

本発明の好ましい例により、精製されたSLPを使用してクエン酸緩衝液（pH4.0）中に懸濁されたCNTに添加して自己集合反応を行ってSLPでラッピングされたCNTを製造した（図3）。この反応産物をAFMイメージを通じて確認した（図4、図5）。

10

【0038】

微生物から精製されたSLPは疎水性を有している多様な基質上に自己集合しやすい性質を有している。このような性質を用いてSLPでラッピングされている水溶性CNTが製造できる。

【0039】

前記製造されたSLPでラッピングされたCNTに標的バイオ物質と反応するか結合するレセプターを取り付ける方法は従来の方が利用できる。例えば、基質表面に自己集合されたSLPをグルタルアルデヒドを利用して架橋させる方法（非特許文献23、非特許文献19参照）、またはSLPのN末端にストレプトアビジンを融合させて発現した後、自己集合反応を誘導してバイオチン-アビジン結合を検査する方法（非特許文献20参照）などが利用できる。

20

【0040】

本発明のバイオセンサーを用いてレセプターに結合するか、又は反応する標的バイオ物質を検出する方法は従来知られている様々な方法が使用できる。バイオセンサーの電気的特性を測定するプローブステーション及び、バイオセンサーから発生される蛍光物質を検出する蛍光顕微鏡を用いて、反応結果を測定することができる。また、反応物に放射線同位元素を取り付けて反応させた後、一定の面で計測器を用いて放射線を測定する既存の方法を利用することもできる（非特許文献24参照）。

【0041】

電気的性質を用いて液相中で測定できる方法として酸化還元反応と電荷の蓄積量を用いる方法が利用できる。酸化還元反応は現在普遍化された電気化学的検出法であって、サイクリックボタメトリー（cyclic voltametry）、ポテンシオメトリー（potentiometry）、及びアンペロメトリー（amperometry）などの利用して水素または電子の変化が測定できる。

30

【0042】

また、液相中で底の基板に荷電されたイオンの電荷量を測定する方法としてはチップを形成する上層基板に電極を形成し、上層基板の電極が帯電される程度を測定してCNTに形成されたイオンの濃度を測定することができる。ここで、電解質と電流の関係は、“電解質水溶液の濃度 \propto 電流の強さ”である。即ち、CNT表面に生じた反応物のイオン濃度による電解質の濃度分布が電流の強さに比例するので、底の基板で形成されたイオンの濃度を測定することができる。

40

【0043】

以下、本発明をより具体的に説明するために、実施例を用いて説明する。しかし、本発明による実施例はいろんな他の形態で変形でき、本発明の範囲は下記のような実施例に限定されるものではない。本発明の実施例は当業者に本発明をより安全に説明するために供されるものである。

【0044】

特に、下記実施例では自己集合物質としてSLPだけを例示したが、CNT上で自己集合されて水溶性を示すものなら、制限なく使用することができる。また、このような自己集合物質を混合して使用することも可能し、これら全てが本発明の範囲に属する。

50

【0045】

また、下記実施例ではSLPでラッピングされた水溶性CNTだけを例示したが、前記SLPでラッピングされた水溶性CNT上のSLPに酵素基質、リガンド、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、RNA、PNA、脂質、コファクター、炭水化物などのレセプターを固定してバイオセンサーを製作し、これを利用して前記レセプターに結合するか、反応する標的バイオ物質または有機化合物を容易に検出することは当業者に自明なことである。

【0046】

実施例1：SLPの製造

【0047】

まず、ナノ自己集合できるSLPを効率的に生産することができる新しい菌株を探すために、多様な菌株 (*Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Geobacillus stearthermophilus* など) からSLPの生産可否を確認した。様々な菌株を選択して培養した後、SDS-PAGEで分析した結果、SLPの生産効率が一番いい菌株は高温で培養可能な *Geobacillus stearthermophilus* であった。

【0048】

SLPの大量生産のため *Geobacillus stearthermophilus* (KTCT2107) を高濃度で培養した。前記菌株は超高熱性グラム陽性バクテリアで、適当な培養温度が非常に高く、このような超高熱性の菌株を高濃度で培養した例はない。高濃度培養はR/2倍地を利用して55℃で行った。500g/Lのグルコース、50g/Lの酵母抽出物、15g/Lの $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ の組成を持った培地溶液をD-O-s-t-a-t方式で供給するが、グルコースによるカタボリック阻害と細胞分解を防ぐため、供給時のグルコース濃度が1g/Lを超えないように調節した。65時間培養後、細胞濃度は10g/Lであった。このような結果は今まで培養した中で最も高い濃度の高熱性細菌である。この時、SLPの生産程度をSDS-PAGEを用いて分析して、全体タンパク質の30%以上の効率で生産されたことを確認した。

【0049】

SLPを分離するため、まずフレンチプレス (APVシステム、イギリス) を用いて細胞を完全に破碎した後、0.5%トリトンX-100で1時間前処理した。前処理された物を5MのGuHClで溶かし、4℃で2時間SLPを抽出した後、遠心分離 (40,000g) で細胞外膜を取り除いた。最後に上澄液を透析して純粋なSLPを効率的に分離した。

【0050】

分離されたSLP含有溶液を64μLずつ取ってSDS-PAGEサンプル溶液 (25%グリセロール、2%SDS、14.4mM2-メルカプトエタノール及び0.1%ブロモフェノールブルーを含む60mMトリス-HCl) 16μLと混合して10分間沸かした後、12%分離用ゲルでSDS-PAGEを行った。ゲルは染色溶液 (メタノール40%、酢酸10%及びcoomassie brilliant blue R 0.25g/L) で2時間以上浸漬して染色し、また脱色溶液 (メタノール40%及び酢酸7%) に2時間以上ずつ2回浸漬して脱色した。

【0051】

図2で、レーンMは標準タンパク質分子量を表し、レーン1とレーン2は前記過程を通じて精製されたSLPを現す。図2で示すように、SLPは非常に効率的に分離・精製された。

【0052】

実施例2：SLPでラッピングされたCNTの製造

【0053】

本発明で使用されたCNTはCarboLex Inc. からCNTを入手して分離・精製してから使用した (非特許文献25参照)。実施例1で精製されたSLPを20mM

10

20

30

40

50

クエン酸緩衝液 (pH 4.0) に先に懸濁させた CNT (100 μ g) と混合し、SLP の最終濃度が 1 mg/mL になるように混合した後、常温で 10 時間放置して自己集合反応を誘導した (図 3)。SLP は疎水性を有する CNT 上に自己集合する性質を持っていて、特別な条件を加えなくても SLP でラッピングされている水溶性 CNT をよく製造することができる。

【0054】

反応が終わった後 SLP-CNT 反応産物を 6,000 rpm で 5 分間蒸留水で 3 回洗浄して、20 μ L の SLP-CNT 反応産物をシリコンウェハーの滴下した後、このウェハーを真空がかかっている 3,000 rpm で 30 秒間遠心分離した。

【0055】

実施例 3: SLP でラッピングされた CNT の確認

【0056】

実施例 2 で生物学的な自己集合反応を通じて製造された SLP-CNT 反応産物は下記のような方法で AFM (Atomic Force Microscopy) イメージを確認した。

【0057】

原子間力顕微鏡 (NanoScope III Multimode System, Digital Instruments) をタッピングモード (tapping mode) で運転して空気中で分析し、チップはナノプローブ TESP を使用した。典型的に柔らかい試料分析で接触モード (contact mode) の適用が難しいから、これを克服するためタッピングモードと命名された技法が用いられるし、試料と探針の間の引力も考慮してイメージを得る非接触モードの技法が利用することもある。時によってタッピングモードをダイナミックモードとも命名して、非接触モードとダイナミックモードを全部含めて非接触モードとも言える。周波数は 240-280 kHz、スキャン速度は 1.97 Hz で分析した。

【0058】

図 4 と図 5 は AFM 分析を通じて SLP がラッピングされた CNT の結果を示すイメージである。スキャンサイズは 0.8 μ m であって、スキャン速度は 0.7825 Hz であった。約 650 nm 長さを持つ CNT をラッピングしている SLP が CNT を被覆している形状でイメージ化されていることを示している。

【0059】

以上、本発明の内容の特定な部分を詳しく記述したが、当業者において、前記の具体的な技術はひたすら望ましい実施の様態であるだけで、これによって本発明の範囲が制限されないことは明白なことである。故に本発明の実質的な範囲は添付された請求項とその等価物によって定義される。

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図 1】自己集合する有機超分子の模型を示す図であり、図 1a は円板型又はディスク型デンドリマー 1 及び扇形の有機超分子 2 が自己集合によって円柱形態 3 を作り、これらの円柱が六角形に配列された 3 次元構造 4 を形成することを示し、図 1b は棒-鎖型又は円錐型の分子 5 が自己集合によって球型 6 を作り、これらの球が集まって 3 次元の空間上に一定の構造 7 で配列されることを示している。

【図 2】精製された SLP に対する SDS-PAGE 結果を示す図である。

【図 3】SLP を利用して CNT をラッピングする方法を示す概略図である。

【図 4】AFM 分析を通じて SLP でラッピングされた CNT の結果を示すイメージである。

【符号の説明】

【0061】

1 円板型又はディスク型デンドリマー

2 扇形の有機超分子

10

20

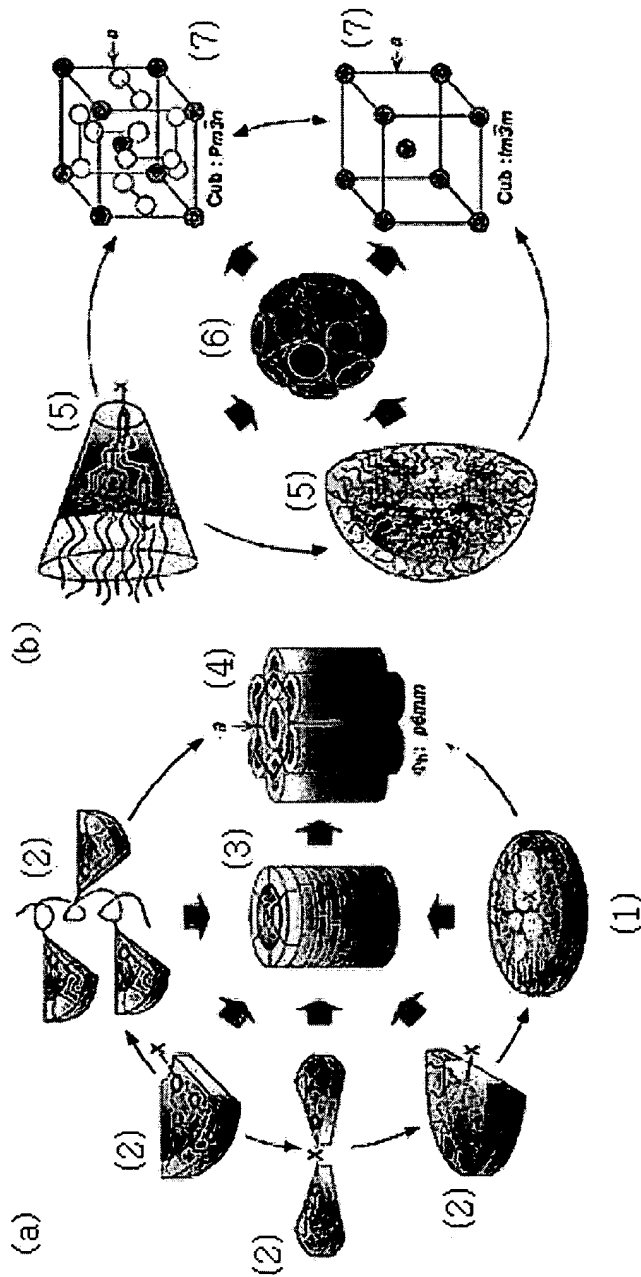
30

40

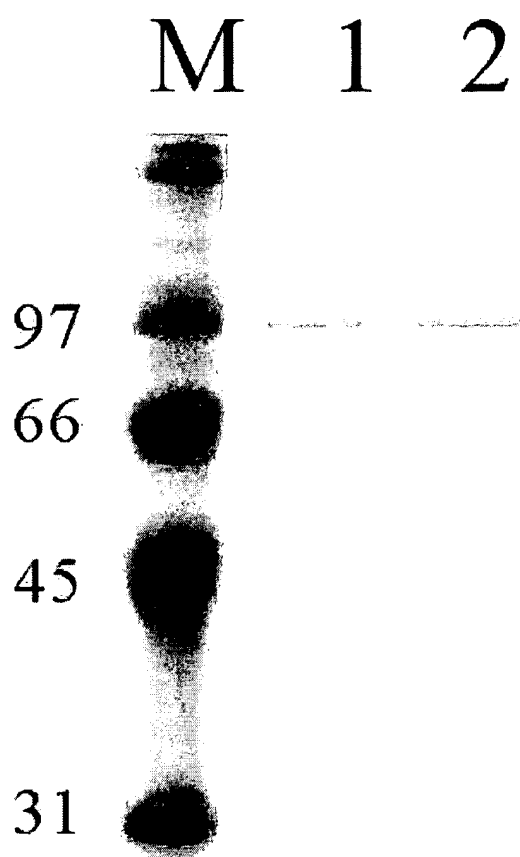
50

- 3 円柱形態
- 4 3次元構造
- 5 円錐型の分子
- 6 球型
- 7 一定の構造

【図 1】

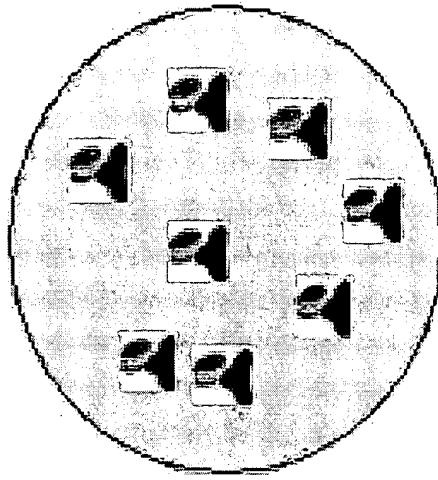


【図 2】

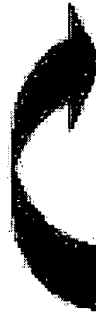


【図 3】

S L P 単量体



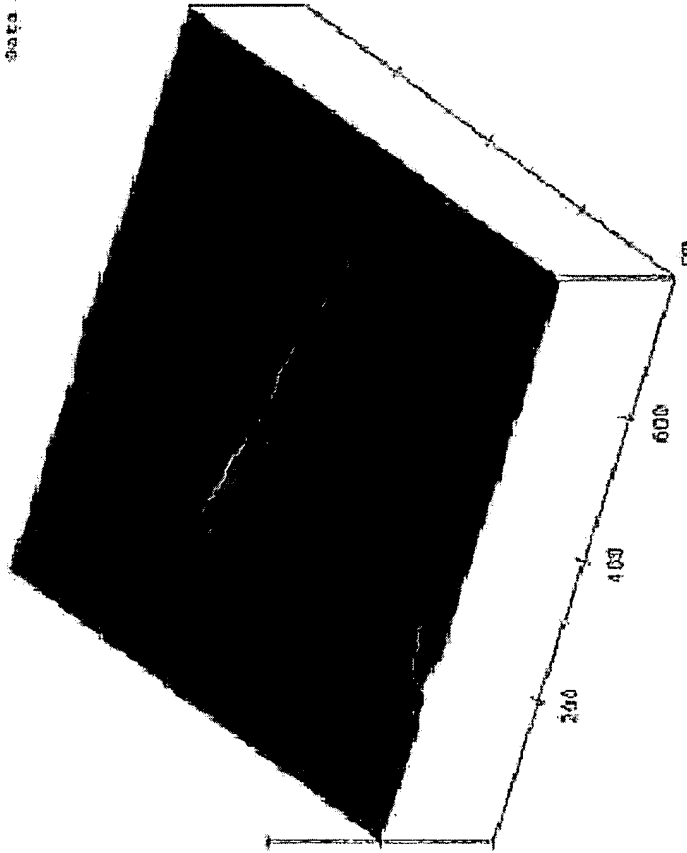
C N T s



C N T の周囲に自己集合された S L P

【 4 】

Digital Instruments NanoScope
Scan size 800.0 nm
Scan rate 1.997 Hz
Number of samples 512
Image Data Height
Data scale 100.0 nm



view angle
light angle

slp-ent-1

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

// C 0 7 K 14/195

C 0 7 K 14/195

(72)発明者 リー サン ヤップ

大韓民国 タエジョン 305-761, ユソング, ジョンミンードン 464-1, エ
キスポ, アpartment 212-702

(72)発明者 ジュン ヒー テー

大韓民国 タエジョン 305-340, ユソング, ドーヨンードン, 383-2, ク
ァキウォン プロフェッサー Apartment 3-403

(72)発明者 リー セオク ジェー

大韓民国 タエジョン 305-729, ユソング, ジョンミンードン, セジョン アパ
artment 105-1001

(72)発明者 パーク ジョン ピル

大韓民国 ギョンギドー 449-905, ユンジンーシ キヒュンーアップ, サンガルーリ
, ガンファーマウル, ジュゴン グリーン ビル 310-805

(72)発明者 パーク テー ジュン

大韓民国 タエジョン 305-390, ユソング, ジョンミンードン 363-9, セ
カンド フロアー

(72)発明者 チョイ ジョン ヒュン

大韓民国 タエジョン 301-070, ユソング, ジョーング, モクードン 52-6
3, ヒュン プー ジュタエク 404

F ターム(参考) 2G045 DA36

4B063 QA01 QA18 QQ21 QQ42 QQ52 QQ61 QR48 QR82 QS15 QS36

4H045 AA30 BA10 BA60 DA50 EA34 EA50